

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 258 号	学位申請者	時任 紀明
審査委員	主査	西尾 善彦	学位
	副査	井本 浩	副査
	副査	宮田 篤郎	副査
			橋口 照人

主査および副査の5名は、平成25年10月16日、学位申請者 時任 紀明 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 今回の Matrix metalloproteinase (以下、MMP)-1 発現以外に、Cardiotrophin (以下、CT)-1 とプラーク破綻との関連性を示した知見はあるのか。

(回答) プラーク破綻と関連の深い単球・マクロファージにおいて、CT-1 は IL-6 や IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインを誘導すると報告されています。

質問2) MMP-1 の活性化にはどのようなメカニズムが考えられるのか。

(回答) 泡沫細胞由来の活性酸素種 (以下、ROS)、CRP、アンギオテンシン II などによって MMP-1 が活性化されると報告されています。

質問3) それでは、CT-1 刺激で分泌された precursor form の MMP-1 は、動脈硬化巣の病的環境においては活性化されると考えてよいのか。

(回答) そのように考えております。

質問4) 大動脈の内皮細胞を用いた実験結果を、そのまま冠状動脈に当てはめてよいのか。

(回答) プラークの不安定化や急性冠症候群の発症メカニズムに関する研究においては、やはり冠状動脈の内皮細胞を用いるのが理想的であり、今回の研究の限界の1つと考えます。

質問5) 免疫染色の写真では、細胞質より核に MMP-1 発現が認められているようにも見えるが、どの抗体を用いたのか。

(回答) ご指摘のとおり、論文掲載の免疫染色の写真では核の染色が増強しているようにも見えますが、MMP-1 蛋白は細胞質に局在しており、実際の病理所見では細胞質が染まっていると判断致しました。第一ファインケミカル社から市販されている抗 MMP-1 抗体 (マウス、モノクローナル) を使用しています。

質問6) MMP-1 蛋白の発現を検討した Western blot 法では、total lysate を使用したのか。

(回答) そうです。

質問7) MMP-1 遺伝子の発現は主に Activating protein (以下、AP)-1 依存性だが、STAT の下流シグナルは何ですか。

(回答) MMP-1 のプロモーター領域には AP-1 以外に STAT の結合部位も存在しておりますので、STAT が直接 MMP-1 遺伝子の転写に関与しているものと考えております。

質問8) CT-1 によって MMP-2 や MMP-9 などの発現も増加する可能性があるのか。

(回答) その可能性は十分にあると思いますが、今回は検討しておりません。

質問9) 血管平滑筋細胞やマクロファージにおいても、CT-1 が MMP-1 発現を誘導するという報告があるのか。

(回答) どちらの細胞においても、また内皮細胞においても、CT-1 が MMP-1 発現を誘導することを示したのは、今回の研究が初めてです。

質問10) CT-1 には心筋細胞の増殖・肥大作用があるが、その細胞内シグナルは今回と同じなのか。

(回答) 同じ JAK/STAT 系が、主なシグナル伝達経路と言われています。

質問11) CT-1 は今回用いた内皮細胞に対しても増殖作用を示すのか。

(回答) 血管平滑筋細胞の増殖作用は報告されていますが、内皮細胞での報告はありません。

質問12) CT-1 投与後8時間までは MMP-1 蛋白の分泌量に変化が認められなかった理由はどのように考えるか。

(回答) CT-1 投与から有意な MMP-1 mRNA の発現が認められるまで8時間かかっていますので、MMP-1 蛋白の合成・分泌には、それ以上の時間がかかったものと考えられます。

最終試験の結果の要旨

質問 13) 内皮細胞数に依存した MMP-1 の分泌増加ではないのか。

(回答) 細胞数をカウントし、細胞 10^5 個あたりの MMP-1 分泌量に補正をしているので、内皮細胞数に依存した増加ではないと考えています。

質問 14) 1.5 倍~2 倍という小さな変化量を、 10^5 個という細胞数の補正で担保できるのか。

(回答) ご指摘の通り、補正後もなお、細胞数の影響は完全には否定できないと考えます。ただし、今回の MMP-1 分泌量の測定結果は、いずれも標準誤差の非常に小さい再現性の高いものであったことから、測定結果の信頼性は高いと考えています。また分泌量の変化率は、細胞内の遺伝子・蛋白の変化率とほぼ一致しています。

質問 15) 細胞内の遺伝子・蛋白レベルを確認した上で、さらに分泌量まで測定しているが、その理由は何か。

(回答) MMP-1 蛋白が増加していることを裏付ける目的で、細胞内のみならず培養液中の MMP-1 蛋白量も測定致しました。

質問 16) 遺伝子の発現量を調べるのに、RPA を用いたメリットは何か。

(回答) 古典的な Northern blot 法との違いは、RPA は mRNA 全長が保存されていなくてもその検出が可能であることです。また、qRT-PCR 法に比べると RPA は感度では大きく劣りますが、遺伝子増幅プロセスがないために特異性では優ります。今回は RPA にて (増幅しなくても) 統計学的に有意な MMP-1 mRNA 量の変化が確認できましたので、qRT-PCR 法まで行う必要はないと判断致しました。

質問 17) CT-1 による刺激実験では、細胞に starvation を行っているのか。

(回答) 行っております。

質問 18) 通常血清入りの培養液を用いた場合は、MMP-1 の発現がさらに高くなる可能性があるのか。

(回答) 血清入りの培養液下での CT-1 刺激実験は行っていないため分かりませんが、一般的に血清中には様々な成長因子やホルモンなどが含まれている可能性がありますので、それらの刺激によって MMP-1 発現が高くなる可能性はあると思います。

質問 19) MMP-1 分泌量を補正するための細胞数カウントはどの時点で行ったのか。

(回答) 培養プレートから conditioned medium を採取した直後に行っています。

質問 20) Seeding 時の細胞数と比較しないと、CT-1 の細胞増殖能の有無は分からないのではないのか。

(回答) Seeding 時のカウントは行っておらず、今後検討したいと思います。Starvation 下での CT-1 刺激によって細胞数の明らかな増加傾向は認められませんでした。コントロール群に比して軽度の細胞保護効果は認められました。CT-1 の抗アポトーシス作用の関与も考えられます。

質問 21) 抗 IL-6 抗体や抗 MCP-1 抗体の働きは確認しているのか。

(回答) 今回の研究では確認しておりませんでした。今後検討したいと思います。

質問 22) JAK 系と MAP kinase 系の薬理的阻害剤に関して、どちらも同等に MMP-1 発現を抑えている理由は何か。相互作用している可能性があるのか。

(回答) JAK 系の阻害剤によって CT-1 受容体の自己リン酸化が抑制され、MAP kinase 系の活性化にも影響を与える可能性はあると思います。実際、JAK と ERK の相互作用を示した論文もあります。また一方で、各薬理的阻害剤の off-target effect の関与も考えられます。

質問 23) CT-1 の制御について、どのようなメカニズムがあるのか。

(回答) 動脈硬化薬においては、これまでに CT-1 upregulation 作用が報告されている ROS や低酸素、IL-6、TNF- α 、アルドステロンなどが関与している可能性が考えられます。

質問 24) CT-1 が二面的な作用を有することを示唆するデータが他に他にあるのか。

(回答) CT-1 に関するデータはありませんが、同じ IL-6 ファミリーに属する Oncostatin M については、細胞外マトリックスの代謝に対する二面的な作用が報告されています。

質問 25) CT-1 が、実際の急性冠症候群発症にどれほど関与していると考えているのか。

(回答) 今回の基礎実験のみでは判断できず、今後 *in vivo* 研究による更なる検証が必要と考えます。ただし、CT-1 による MMP-1 の増加効果は、他の炎症性メディエーターと比して軽度と言えます。

質問 26) CT-1 作用を抑制することでの臨床的デメリットはあるのか。

(回答) CT-1 には虚血性心疾患での心保護作用や抗肥満作用といった臨床上有益な作用も報告されているので、これらを妨げないような投与方法の開発が必要と考えます。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。